

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

GIULIA MANSO MARCHIORO

**ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* DE DIFERENTES REGIÕES
DE SERGIPE E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS ESTIRPES
SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti***

São Cristóvão, SE
2016.2

GIULIA MANSO MARCHIORO

**ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* DE DIFERENTES REGIÕES
DE SERGIPE E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS ESTIRPES
SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Sergipe requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biologia

Orientadora: Prof. Dr Sona Arun
Jain

São Cristóvão, SE

2016.2

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cynthia Lara de Castro Manso e Murilo Marchioro, por todo incentivo e suporte, emocional e financeiro, desde o início da minha trajetória.

À minha orientadora Profa. Dra. Sona Arun Jain pela orientação, correções e sugestões prestados durante a elaboração do trabalho, mas também, todos os ensinamentos, incentivos e amizade em, praticamente, todos os meus anos na universidade.

À Prof. Dr. Rose Monnerat, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), por me receber na Embrapa e dar todo o auxílio e conhecimento para que eu entedesse minuciosamente de parte da técnica realizada para este trabalho.

À minha amiga e parceira de laboratório, Ediclécia, por todo apoio, companheirismo e ensinamentos em microbiologia, que sem sua ajuda não seria o mesmo.

Aos meus amigos do curso, Andréa, Bia, Juliana, Adelle, Damyres, Leoni, Dário, Belgrano e todos os outros que me acompanharam e compartilharam muitos momentos bons e ruins, risadas e estresses.

Ao pessoal do laboratório, alunos e professores, pelo companheirismo e auxílio que foi dado quando precisei.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia, em especial Carlos e Marta, que além de todo o suporte com a esterilização dos materiais, me proporcionaram muitas risadas e conversas.

Aos demais professores do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão, pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas.

À Capes pela oportunidade de estudo fora do país e experiência adquirida em uma universidade estrangeira pelo programa “Ciências sem Fronteiras”.

À Copes pelo financiamento do projeto elaborado para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O Brasil é um país predominantemente tropical, sendo um local adequado para disseminação do vetor de doenças, *Aedes aegypti*. Como ainda não é fácil o acesso a uma vacina eficaz para dengue, Zika e Chicungunya, é importante que haja o controle do mosquito no ambiente. O método mais utilizado atualmente para o controle, é o uso de produtos químicos, os quais os mosquitos desenvolveram resistência e trazem consequências negativas ao meio ambiente. O controle de dípteros mediado pelo uso de bioinseticidas, baseados em *Bacillus thuringiensis*, tem se tornado uma alternativa satisfatória. Bt produzem cristais de proteínas tóxicos para diversas ordens de insetos, denominadas proteínas Cry (crystal) e Cyt (cytolytic). O presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e selecionar estirpes de *B. thuringiensis* e avaliar sua toxicidade sobre larvas de *Ae. aegypti*. Foram isoladas 150 colônias de *B. thuringiensis* provenientes do solo de diferentes regiões de Sergipe por meio do método de isolamento por enriquecimento. Dentre as colônias isoladas, 85 foram caracterizadas como estirpes de *B. thuringiensis* e 39 foram usadas em bioensaio contra larvas de *Ae. Aegypti*. Foram descritos dois tipos morfológicos para os esporos: elipsoidal (grandes e pequenos) e formato redondo. Para os cristais, foram encontrados do tipo acoplado ao esporo e não-acoplado, possuindo morfologia do tipo redonda, irregular, bipiramidal, cuboide e “cap-like”. Não foi encontrado nenhuma estirpe tóxica contra as larvas de *Ae. aegypti*. O projeto contribuiu para o desenvolvimento do banco de cepas de *B. thuringiensis* e ao início de futuros projetos, como a análise do sequenciamento das estirpes e bioensaio com outros organismos, inclusive com protozoários e células cancerígenas humanas.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, Cristais de proteína.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i>	11
FIGURA 2 - Esquema da proteína Cry com três domínios	17
FIGURA 3 - Formato elipsoidal dos esporos e proteínas redondas e não acopladas aos esporos.....	29
FIGURA 4 - Formato redondo dos esporos e proteínas acopladas aos esporos ...	29
FIGURA 5 - Formato elipsoidal dos esporos e proteínas acopladas nas duas extremidades dos esporos (“cap-like”)	31
FIGURA 6 - Formato elipsoidal dos esporos e proteínas acopladas em apenas uma extremidade (“cap-like”)	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros morfológicos de seleção	26
TABELA 2 - Número de colônias Bt selecionadas para cada amostra de solo.....	28
TABELA 3 - Resumo dos tipos de cristais de proteína encontrado	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1. Dengue, Zika e Chikungunya.....	9
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	10
2.2. Ações para controle do mosquito.....	12
2.3. Inseticidas químicos.....	13
2.4. Inseticidas biológicos	14
2.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.6. δ -endotoxinas.....	16
2.7. Técnicas de isolamento	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Geral.....	20
3.2. Específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Coleta de amostras	21
4.2. Processamento das amostras.....	21
4.3. Teste de Gram	22
4.4. Técnica de Azul Brilhante Comassie (CBB).....	23
4.5. Bioensaio.....	24
4.5.1. Bioensaio seletivo	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Coleta das amostras	25
5.2. Processamento das amostras.....	25
5.3. Teste de Gram e análise das células vegetativas.....	26
5.4. Seleção das estirpes Bt.....	26
5.5. Análise da estrutura dos esporos e proteínas.....	28
5.6. Bioensaio.....	32
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICE	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país predominantemente tropical, sendo um local adequado para disseminação de mosquitos vetores de doenças por seu clima úmido e quente. Ao longo da sua história, o país foi alvo do vírus da dengue (DENV), transmitido pelo vetor de origem africana, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e marcado por diversas infestações e re-infestações (TAUIL, 2002).

Atualmente já são encontrados quatro sorotipos de DENV no país e mais de um milhão de casos de dengue somente em 2016 (VALLE *et al.*, 2016; BOGAZ, 2017). Ademais, com a introdução dos vírus da Zika (ZKV) e Chikungunya (CHIKV) no Brasil, ambos também transmitidos pelo *Ae. aegypti*, aumentou preocupação ao setor de saúde pública, alertando ainda mais para o controle do vetor. Em 2016, foram registrados mais de duzentos mil casos de doentes pelo ZKV e aproximadamente 260 mil ocorrências pelo CHIKV (BOGAZ, 2017).

Como ainda não existe uma vacina eficaz para tais arboviroses (MS, 2016), é necessário que haja o controle do mosquito no ambiente, diminuindo as chances da disseminação do vírus na população. O método mais empregado para reduzir a população de mosquitos é o uso de produtos inseticidas, os quais podem ser encontrados em dois modos, com princípio ativo químico e biológico, sendo o químico ainda mais utilizado (BRAGA e VALLE, 2007). Porém, estes produtos podem causar sérios impactos sobre a saúde humana, favorecer ao desequilíbrio ecológico e resistência dos mosquitos (POLANCZYK *et al.*, 2003; MATSUMURA e RIBAS, 2009).

Uma alternativa ao uso de inseticidas químico para o controle do vetor é a utilização de produtos biológicos. Para este tipo de produto estão sendo utilizadas bactérias com eficiência no controle dos mosquitos de importância médica (BRAGA e VALLE, 2007). Os estudos mostram que o uso de produtos à base deste patógeno apresenta vantagens sobre os produtos químicos, entre elas a de serem menos impactantes ao meio ambiente, não prejudiciais aos seres humanos, mais eficientes em relação à resistência dos mosquitos e mais econômico no desenvolvimento da pesquisa (PETRY *et al.*, 2004). Entre os agentes microbianos, *Bacillus thuringiensis israelenses* (*Bti*) é o mais utilizado mundialmente por promover toxicidade contra larvas do *Ae. aegypti*.

Bacillus thuringiensis é uma espécie Gram-positiva, naturalmente encontrada nos solos, com formação de esporos durante condições adversas, e sua toxicidade resulta de cristais parasporais (δ -endotoxinas) formados durante a fase de esporulação (GLARE e O'CALLAGHAN, 1998). O modo de ação dessas proteínas se dá a partir da ingestão e da solubilização dos cristais no intestino médio dos organismos alvos. Estas se ligam à receptores na parede celular do intestino dos organismos, formando poros celulares, causando aumento da permeabilidade da membrana, desequilíbrio iônico e consequente lise celular (GLARE e O'CALLAGHAN, 1998; FIUZA, 2009). Estas bactérias produzem diferentes proteínas com diferentes níveis tóxicos, específico, para cada grupo alvo.

Pesquisadores de todas as partes do mundo estão à procura de mais e novas proteínas além das já existentes e genes mais eficientes aos seus grupos alvos. Este projeto visou isolar e caracterizar cepas de *B. thuringiensis* provenientes de solos de diferentes regiões do estado de Sergipe, seguido de bioensaios sobre larvas de *Ae. aegypti*, a fim de contribuir com a identificação de novas estirpes de *Bt* com atividade tóxica contra dípteras.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Dengue, Zika e Chikungunya

Arboviroses são doenças causadas por vírus que são transmitidos por artrópodes e desenvolvem boa parte do seu ciclo replicativo dentro dos mesmos (LOPES *et al.*, 2014). Os arbovírus são carregados, principalmente, por insetos hematófagos (vetores) e podem ser transmitidos facilmente aos vertebrados (reservatório) através da sua picada, ampliando a sua distribuição pelo ambiente (LOPES *et al.*, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde alerta a população para três arboviroses emergentes (Dengue, Zika e Chikungunya) nos últimos anos (MS, 2017). Um fator comum entre as três é o vetor transmissor, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Desde 1986, epidemias de dengue pelo DENV (família: Flaviviridae, gênero: *Flavivirus*) têm ocorrido no Brasil, e desde então programas de controle do vetor tem sido realizado para enfrentar o problema pela falta de uma vacina eficaz contra o organismo alvo (VALLE *et al.*, 2016). Porém, quando os surtos da doença são

diminuídos, há falhas na vigilância entomológica por parte do poder público, ocasionando a re-infestação do mosquito, seguido-se de uma nova epidemia.

Atualmente já são conhecidos quatro sorotipos de DENV no país (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e mais de um milhão de casos registrados em 2016 (VALLE *et al.*, 2016; BOGAZ, 2017). Somado a isso, em 2004, ocorreu a entrada do vírus da febre da Chikungunya (família: Togaviridae, gênero: Alphavírus) no continente americano, alertando os serviços da saúde para a preparação contra esta nova arbovirose no Brasil. Somente em 2014 foi registrado o primeiro caso no país, que foi no estado do Amapá, na cidade Oiapoque (LIMA-CAMARA, 2016; VALLE *et al.*, 2016). A Chikungunya está associada à dores recorrentes nas articulações e à altas taxas de infecções sintomáticas (NUNES *et al.*, 2015)

Os primeiros casos autóctones de infecção pelo Zika vírus (família: Flaviviridae, gênero: Flavivirus) ocorreram em 2015. A maioria das pessoas infectadas pelo vírus apresentou-se assintomáticas, o que dificulta o registro exato de ocorrências da doença, seu diagnóstico e tratamento (HENNESSEY, 2016). Outro fator preocupante abordado pelo Ministério da Saúde é a relação entre o número de casos de microcefalia em recém-nascidos em 2015 e grávidas infectadas pelo vírus, no qual ambos apresentaram o RNA do vírus em questão (HENNESSEY, 2016). Isto gerou uma hipótese de que o vírus pode ser transferido da gestante para o feto, causando problemas maiores para o bebê. Contudo, ainda não se sabe ao certo quantos destes casos de microcefalia estariam relacionados ao vírus (HENNESSEY, 2016).

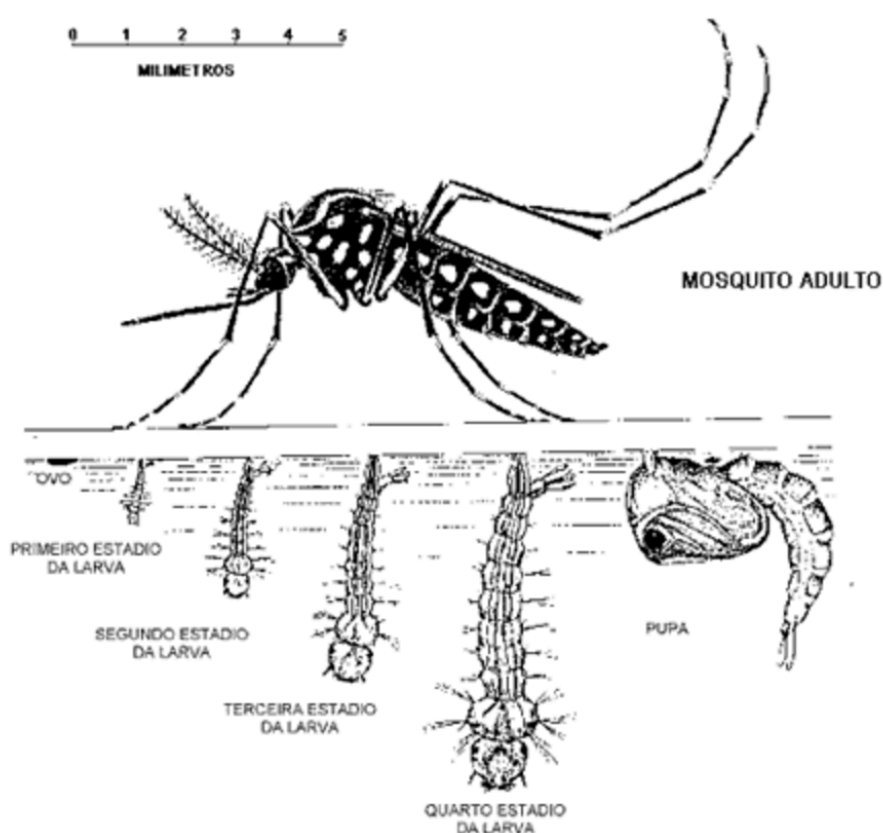
2.1. *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é de origem Africana e está presente normalmente em zonas tropicais e sub-tropicais e em baixa altitudes, em razão das temperaturas elevadas e o clima úmido (BRAGA e VALLE, 2007). Porém, devido às mudanças climáticas, já há relatos do mosquito em ambientes temperados, como na Califórnia, EUA (CALIFORNIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH, 2015). Segundo informações do Instituto Oswaldo Cruz (2008), sua distribuição é ampla, à nível mundial, podendo ser encontrado em diversos países da África, América e Ásia, como também na Austrália e Polinésia Pacífica.

O mosquito se distribui principalmente em áreas urbanas, se reproduzem em água parada limpa ou pouco suja, como em acúmulo em tonéis, vasilhas e pneus

abandonados, e geralmente se alimentam no início da manhã e começo da noite (WHO, 2016; BRAGA e VALLE, 2007). Para o gênero *Aedes* é comum a ovoposição não diretamente na água, mas próxima a ela, ou em locais potencialmente inundáveis, os quais são adequados para o desenvolvimento das larvas aquáticas do mosquito (NATAL, 2002).

Os ovos podem ser viáveis em um período de até um ano, se o local onde estiver não for adequado para eclosão (NATAL, 2002). No período do desenvolvimento larval deste organismo ocorrem três mudas, seguindo-se as fases de pulpa e alada do mosquito, em temperatura ótima entre 20°e 30 (NATAL, 2002) (Figura 1).



Fonte: www.dengue.org.br

Figura 1. Desenvolvimento do *Aedes aegypti*

Os machos da espécie alimentam-se de carboidratos de origem vegetal, já as fêmeas do mosquito, além de se alimentarem de carboidrato, também são hematófagas para a maturação dos ovos (IOC/Fiocruz, 2016). Acredita-se que a fêmea se alimenta três vezes ao dia e pode ovopositar mil ovos em um mês (IOC/Fiocruz, 2016). Por isso, esta espécie se adaptou muito bem ao ambiente

urbano e ao ser humano, o qual é a fonte para sua alimentação, e consequentemente, para a reprodução e domínio deste ambiente.

2.2. Ações para controle do mosquito

Acredita-se que o *Ae. aegypti*, originalmente da África, foi trazido para o Brasil no período colonial em meios de embarcações com o comércio de escravos pelos portugueses. Consequentemente, com a urbanização intensa e destruição de habitats naturais do mosquito, o mesmo adaptou-se a ambientes domésticos e foi disseminado pela população facilmente. No início do século XX, o *Ae. aegypti* tornou-se um grande problema no Brasil, não devidamente por causa da dengue, mas sim por epidemias de febre amarela na época (BRAGA e VALLE, 2007)

No entanto, em 1955, com a infestação do mosquito, o governo brasileiro erradicou o mosquito no território, pela primeira vez na história, a partir de planejamento de ações práticas contra o vetor da febre amarela com o apoio da Organização Pan-Americana da Saúde e a Organização Mundial da Saúde (BRAGA e VALLE, 2007). Porém, devido falhas no processo da vigilância entomológica e ao intenso processo do crescimento urbano, houve diversas re-infestações em anos seguintes pelo *A. aegypti*, o que propiciou a chegada de novas epidemias no país.

Sabe-se que em países em desenvolvimento, onde há baixa qualidade na infraestrutura e discrepância socioeconômica, a tarefa de erradicação do mosquito é quase impossível. Por isso, no caso do Brasil, o governo desistiu de implementar ações de erradicação do vetor. Em 2002, foi aprovado o projeto que prioriza o controle do mosquito no ambiente, denominado Plano Nacional do Controle da Dengue (PNCD), em função do aumento do risco de epidemias (ZARA *et al.*, 2016).

De acordo com o PNCD, as estratégias abordadas como eficazes no controle do mosquito são de três tipos: controle mecânico, químico e biológico. O primeiro aborda práticas para eliminação do vetor, dos criadouros ou diminuição do contato com o homem sem a utilização de nenhum produto. Para isto, é necessário a retirada ou o descarte correto de criadouros artificiais, como vasilhas e pneus com água e a proteção de janelas com telas contra mosquitos.

Para o controle químico são utilizados produtos adulticidas ou larvicidas sintéticos à base de produtos químicos, sendo o método mais utilizados atualmente no Brasil. E por fim, os produtos biológicos, à base de patógenos ou predadores

naturais dos vetores. Estes podem ser peixes ou invertebrados aquáticos que se alimentam das larvas e pulpas do vetor ou patógenos que apresentam toxinas potentes, como bactérias, fungos ou parasitas (ZARA *et al.*, 2016).

2.3. Inseticidas químicos

Os inseticidas químicos são amplamente utilizados no Brasil. No período do plano de erradicação do mosquito no país, a venda destes produtos aumentou drasticamente nos mercados, principalmente na região sudeste e nordeste do Brasil (MARCORIS *et al.*, 2007). O efeito prolongado da forma ativa dos produtos químicos e a facilidade do seu uso são os requisitos motivadores para o uso desta estratégia (BRAGA e VALLE, 2007). Por outro lado, estes compostos trazem consideráveis transtornos e modificações para o meio ambiente.

Os compostos utilizados como inseticidas químicos são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides sintéticos (RIBAS e MATSUMURA, 2009). Os organoclorados são os produtos mais antigos no mercado e nesta classe está incluso o DDT, o mais conhecido entre esse tipo de inseticida (FLORES *et al.*, 2004). Já os organofosforados são produtos amplamente utilizados pelo Setor Público como larvicidas de uso generalizado e possui a aprovação pela OMS para seu uso em água potável (BRAGA e VALLE, 2007; SILVA *et al.*, 2015). Estes compostos apresentam vantagens por serem biodegradáveis e não cumulativos nos tecidos dos organismos, porém são mais tóxicos aos vertebrados que os organoclorados e instáveis quimicamente (BRAGA e VALLE, 2007).

Além do elevado nível de toxicidade, estes produtos químicos apresentam alto efeito residual no ambiente, resistência pelos vetores alvos devido ao uso intenso e continuado e a contaminação de espécies não alvas. Estas características são as principais razões pela procura de métodos alternativos aos compostos químicos (RIBAS e MATSUMURA, 2009).

2.4. Inseticidas biológicos

Bioinseticidas são geralmente menos tóxicos às espécies não alvos, como aves e mamíferos, e em sua maioria possuem efeito específico, diferente dos produtos químicos convencionais (THAKORE, 2006). Além disso, degradam-se mais rapidamente, podem ser administrados em pequenas dosagens e a resistência adquirida pelos insetos é muito baixa a estes produtos (POLANCZYK, 2003; THAKORE, 2006). Diversos estudos estão sendo aplicadas para o melhoramento da produção em massa, técnicas de estocagem e aplicação destes produtos (THAKORE, 2006).

Os biopesticidas são classificados em pesticidas microbianos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários plantam geneticamente modificadas pela introdução de genes de um organismo tóxico à espécie alvo e outros, como predadores naturais, nematódeos entomopatogênicos e parasitóides (THAKORE, 2006).

O *Bacillus thuringiensis*, é a bactéria patogênica mais amplamente utilizada no mundo como biopesticida e uma alternativa aos produtos químicos. Há vantagens como rápida degradação no ambiente e especificidade ao organismo alvo, porém apresenta ainda alto custo de produção e instabilidade tóxica em campo devido aos raios ultravioleta (POLANCZYK, 2003). Já foi descoberto efeito tóxico desta bactéria contra importantes ordens de insetos como lepidoptera, diptera e coleoptera, outros invertebrados como nematóides, ácaros e protozoários (SCHNEPF *et al.*, 1998) e células humanas (OHBA *et al.*, 2004).

2.5. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) (família: Bacillaceae; gênero: *Bacillus*) é um bastonete Gram-positivo, naturalmente encontrado nos solos, formador de esporos e capaz de produzir toxicidade resultante de cristais de proteína formados durante a fase de esporulação. Foi isolado pela primeira vez por Ishiwata em 1901, quando isolou o agente patógeno das larvas do “bicho-de-seda” (*Bombyx mori*), mas somente em 1911 foi redescrito e nomeado como *Bacillus thuringiensis* por Ernest

Berliner, isolado de larvas mortas de traça da farinha (*Ephestia kuehniella*) (DeLUCCA *et al.*, 1981; MONNERAT *et al.*, 2007).

Bt está agrupado em um complexo com outras espécies de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* e *B. weihenstephanensis*) em razão de suas similaridades genéticas compartilhadas por esse grupo (SANAHUJA *et al.*, 2011; RABINOVITCH e VIVONI, 2016). Este complexo é denominado “complexo de *cereus*”, o qual é formado por bactérias Gram-positivas, esporulantes e provenientes do solo. *Bt* e *B. cereus* são praticamente indistinguíveis, e podem ser apenas diferenciadas pela capacidade do *Bt* de produzir “*insecticidal crystalline proteins*” (ICPs) específicas, o que é determinado por genes presentes geralmente nos megaplasmídeos (30 MDa) (WHO, 1999; LIMA, 2010; RABINOVITCH e VIVONI, 2016).

O *Bt* é o principal microrganismo utilizado como inseticida biológico devido à produção de ICPs ou cristais parasporais, denominadas δ -endotoxinas (forma ativa da proteína). Estes cristais são estruturas de proteínas do grupo Cry (Crystal) e Cyt (Cytolytic), são altamente tóxicos, específicos e constituem o maior grupo de proteínas inseticidas produzidos por *Bacillus* (BOBROWSKI *et al.*, 2003). Já foram verificados mais de 700 genes Cry e 16 genes Cyt codificando estas proteínas, as quais são nomeadas de acordo com a similaridade de suas sequências primárias e toxicidade específica a algum grupo-alvo (SOBERÓN e BRAVO, 2008; PALMA *et al.*, 2014).

A combinação de proteínas Cry e Cyt produzidas pelas bactérias é o que define o nível de toxicidade e a especificidade do isolado de *Bt*. Sabe-se que Cry1 e Cry9 possuem atividade contra a ordem dos lepidópteros, e as dos grupos Cry4 e Cry11 têm alta atividade contra dípteros. O grupo Cry 5 tem atividade contra nematoides e as toxinas dos grupos Cry3, Cry7e Cry8 são tóxicas para a ordem dos coleópteros (SCHNEPF *et al.*, 1998; DELÉCLUSE *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2010).

Apesar de serem encontradas diversas estirpes com alto efeito inseticida, já foi demonstrado que a maioria dos isolados de *Bt* produzidos em ambientes naturais possui proteínas Cry sem efeito tóxico contra insetos (HASTOWO e OHBA, 1992; MAEDA, 2000; MIZUKI, 2000). Com base nisso, descobriu-se proteínas Cry com efeito citotóxico contra células humanas cancerígenas, levando a criação de uma nova categoria das proteínas Cry, as Parasporinas (PSs) (MIZUKI *et al.*, 2000; KITADA *et al.*, 2006)

Existem três sorotipos ou subespécies diferentes (H-10, H-8a:8b e o H14) de *Bt* com toxicidade para os culicídeos, sendo o H14 (var. *Israelensis*) com maior potencial tóxico contra as larvas aquáticas de diptera (GOLDBERG e MARGALIT, 1977; HABIB, 1989). *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis*, sorotipo H14, produz diferentes proteínas do tipo Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa) e tipo Cyt (Cyt1Aa, Cyt1Ca e Cyt2Ba) (IBARRA, 2003; SOBERÓN e BRAVO, 2008; ELLEUCH *et al.*, 2015). Estudos estimam que a presença da toxina Cyt1Aa é a que previne a resistência dos mosquitos às proteínas Cry e em sinergia eleva a atividade tóxica da estirpe (IBARRA, 2003; ELLEUCH *et al.*, 2015). Ademais, as proteínas Cyt1Aa, Cry4Ba and Cry11Aa também possuem atividade antibiótica contra *E. Coli* e algumas bactérias Gram-negativas (GIDDINGS *et al.*, 2009; BEN-DOV, 2014).

Além das δ -endotoxinas, *Bacillus thuringiensis* também é capaz de produzir outros tipos de proteínas que auxiliam a atividade inseticida das δ -endotoxinas. Existem as toxinas secretadas, que são produzidas na fase vegetativa e são denominadas como Vips (proteínas inseticidas vegetativas) e Sips (proteínas inseticidas secretadas) (PALMA *et al.*, 2014). Além destas, existem ainda as β -exotoxinas, substância termoestável e tóxica para alguns insetos (ANGELO *et al.*, 2010) e as α -endotoxinas, com atividade citolítica para algumas ordens de insetos (LIMA, 2010).

2.6. δ -endotoxinas

Os cristais parasporais são produzidos na fase esporulação, juntamente com o endósporo. Na fase de autólise da célula vegetativa, os esporos e cristais são liberados juntos, podendo estar acoplados ou não. A estrutura da proteína Cry é baseada em três domínios (I, II e III), que consistem no centro ativo tóxico da proteína (Schnepf *et al.*, 1998). Cada domínio está relacionado com uma função. O domínio I está envolvido com a perfuração da membrana e a entrada de íons, consequentemente à toxicidade. O domínio II determina a especificidade da proteína, ou seja, está relacionado com o receptor e a inserção da membrana. E por fim, o domínio III está também envolvido com o receptor da membrana e formação de poros (PALMA *et al.*, 2014).

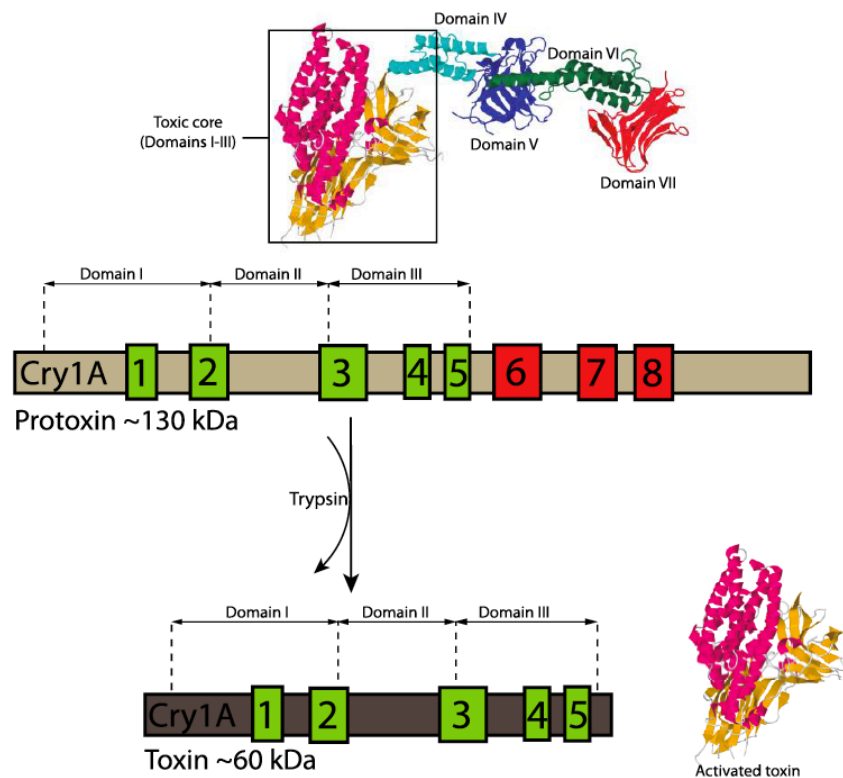


Figura 2. Esquema da proteína Cry com três domínios. Fonte: Palma *et al.*, 2014.

O modo de ação das proteínas Cry se dá a partir da ingestão e da solubilização dos cristais no intestino médio dos organismos alvos, onde ocorre a liberação das protoxinas. A alcalinidade do intestino e a composição dos cristais solubilizados nesta etapa são determinantes para especificidade do Bt à espécie alvo (FIUZA, 2009). A atividade proteolítica ocorre através da ativação das enzimas digestivas que convertem as protoxinas em δ -endotoxinas. Estas se ligam a receptores específicos na parede celular do intestino dos organismos, formando poros celulares, causando aumento da permeabilidade da membrana, desequilíbrio iônico e consequente lise celular (GLARE e O'CALLAGHAN, 1998; FIUZA, 2009).

Já as proteínas Cyt também são liberadas como protoxinas no interior do inseto. Estas proteínas são clivadas nas suas porções terminais, liberando a toxina ativa. Diferente das proteínas Cry, as Cyt não possuem um receptor específico de ligação nas membranas. No entanto, elas se ligam diretamente aos lipídios, formando poros, desestruturando a camada lipídica presente. Esta diferença se deve às proteínas Cyt possuírem apenas um domínio estrutural (SOBERÓN e BRAVO, 2008).

Os cristais podem ser diferenciados, através da visualização ao microscópio, por diferentes morfologias: romboide, bipiramidal, esférico, cubóide e formas irregulares (KAELIN, 1994; BERNHARD et al., 1997; WHO, 1999; LENINA et al., 2014). Alguns autores relacionam a morfologia dos cristais com o tipo de Cry produzida, já outros não concordam com a afirmativa (OHBA, 1995; LENINA et al., 2014). No entanto, já foi relatado que proteínas cuboides, reportado por Lopez-Meza e Ibarra (1996) tem uma afinidade com Cry 3; cristais bipiramidais relacionados com Cry 1 (ARONSON e FITZ-JAMES, 1996) e formas esféricas e irregulares relacionados com Cry 4 e parasporinas (OHBA, 1995; KITADA et al., 2006).

2.7. Técnicas de isolamento

Diversas técnicas foram descritas para isolar *Bacillus thuringiensis* de diferentes tipos de amostras. Porém, existem duas técnicas, amplamente citadas na literatura, para amostras provenientes do solo: o método desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1985) e por acetato de sódio, proposto por Travers e colaboradores (1987). Porém, com o tempo, os pesquisadores aprimoraram e desenvolveram novos procedimentos de isolamento mais eficientes para *Bt*.

O método desenvolvido pela OMS é baseado em tratamento por choque térmico, em que temperaturas elevadas eliminam células vegetativas, consequentemente selecionando as bactérias esporulantes. Por outro lado, Travers *et al.* (1987), observou que os esporos de *Bt* não germinavam na presença de alta concentração de acetato de sódio (0.25 M), enquanto que outras bactérias esporulantes germinavam. Em razão disso, as amostras eram cultivadas em meio com 0.25 M de acetato de sódio e em seguida, as células vegetativas eram eliminadas por tratamento de calor (80°C por 3 minutos). Os esporos restantes eram cultivados em placas com meio rico em ágar e observado que grande parte das que sobraram eram espécies de *Bacillus* e formadores de cristais.

A metodologia proposta pelo OMS foi aprimorada por Santana *et al.* (2008), que introduziram um pré-tratamento de calor para as amostras de solo. Este método consiste em incubar 5 gramas de solo enrolado em papel alumínio em uma estufa a seco por 5 horas, e em seguida prosseguir com a metodologia original do OMS (WHO, 1985). Santana *et al.* (2008), demonstraram que por este método, a seleção

de bactérias *Bt* aumentaram muito em comparação ao método original do OMS para as amostras de solo coletadas. Primeiramente, pode ser que, para estas amostras de solo em que *Bt* apresentava-se em pouca quantidade no solo, este método beneficiou a seleção destas bactérias. Outra alternativa eram que os esporos de *Bt* eram mais resistentes ao calor por um período maior, comparados aos esporos de outras espécies de bactérias.

Por fim, a metodologia de isolamento utilizada no presente trabalho foi desenvolvida por Patel *et al.* (2013). A técnica é denominada como um novo método de enriquecimento para o isolamento de *B. thuringiensis*. O método de enriquecimento consiste em crescimento das amostras em meio GYS (*Glucose Yeast extract Salt*) e tratamento de calor. O meio GYS estimula primeiramente a germinação dos esporos de *Bacillus* e o crescimento de células vegetativas. Porém, por conter apenas 0,1% de glicose e 0,2% de extrato de levedura, limita o crescimento de bactérias não esporulantes e incentiva a esporulação de todas as outras espécies esporulantes por possuir pouco conteúdo nutricional (Patel *et al.*, 2013). Por fim, o tratamento de calor elimina todas as formas vegetativas presentes, restando apenas esporos.

Em seu estudo, Patel *et al.* (2013) demonstraram que, através deste método, as taxas de crescimento, germinação e esporulação de *B. thuringiensis* é maior que para outras espécies de *Bacillus*. Mostrou-se, pelo método de enriquecimento, a porcentagem de colônias *Bt* isoladas por amostra de solo chegavam a 75% do total de espécies isoladas e mais inclusões parasporais foram encontradas em comparação aos outros métodos (Patel *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Isolar e caracterizar novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e testar a atividade delas sobre larvas do *Aedes aegypti*.

3.2. Específicos

- Isolar estirpes de *Bacillus thuringiensis* do solo de diferentes regiões de Sergipe
- Caracterizar as estirpes isoladas por tipos de esporos e proteínas produzidos
- Analisar toxicidade das estirpes isoladas contra larvas do *Aedes aegypti*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras

As coletas foram realizadas em diferentes regiões do estado de Sergipe. Foram coletadas 15 amostras provenientes de reservas naturais, região praiana, plantações orgânicas e convencionais (porém, sem o uso de *Bt* como inseticida) e solo adubado com esterco caprino. Aproximadamente 50 g de cada solo foram coletadas com auxílio de uma espátula e sacos plásticos estéreis, a uma profundidade de 5 a 10 cm em cada local. Os sacos plásticos foram devidamente identificados (localização, data, tipo de solo) e armazenados a 4°C em laboratório até o seu uso.

4.2. Processamento das amostras

As amostras de solo foram tratadas devidamente para bactérias esporulantes, de acordo com o método descrito por Patel e colaboradores (2013), com modificações. Para cada amostra, utilizou-se 1 g de solo como inóculo bacteriano adicionados a 20 ml de solução GYS estéril preparado em balão de 250 ml (GYS por litro: 1 g de glicose, 2 g de extrato de fermento em pó, 2 g de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 0,06 g de MnSO_4 , 0,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g de CaCl_2 , 5 g de K_2HPO_4) incubado por 48 h a 30°C em um agitador rotativo a 250 rpm. Neste processo foi iniciada a seleção de bactérias esporulantes. Após dois dias, uma alíquota de 1 ml foi retirada e centrifugada suavemente a 1000 rpm por 1 min para se estabelecer em partículas de solo. O sobrenadante foi reservado e o pellet descartado. O sobrenadante foi aquecido a 80°C em banho-maria por 3 min para o tratamento térmico e em seguida diluído até 10^{-8} em água peptonada. O choque térmico elimina todas as células vegetativas e não formadoras de esporos (MUNIADY, et al., 2011). Foram plaqueadas 3 diluições para cada solo (100 µL de 10^{-5} diluição, 50 µL de 10^{-4} e 25 µL de 10^{-3}) em placas de Petri com ágar Lúria- Bertani (LB). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas para posterior análise morfológica das estirpes.

4.3. Teste de Gram

O teste de Gram foi realizado para eliminar as estirpes Gram-negativas, selecionando apenas a forma *Bacillus* Gram-positiva. Para a realização do teste, cada colônia foi cultivada em Meio Lúria- Bertani (LB) durante 24 horas para a obtenção das células vegetativas. Para cada amostra foi feito um esfregaço fino e de forma oval em uma lâmina limpa com uma alça bacteriológica previamente flambada. O esfregaço foi deixado secar e em seguida fixado com calor. Para coloração de Gram as lâminas foram cobertas com cristal violeta com o auxílio de um conta-gotas, deixando agir por 1 minuto. Retirado o excesso, foi adicionado a solução de lugol, cobrindo toda lâmina novamente por mais 1 minuto. Foi retirado o excesso pela segunda vez e gotejado o álcool-acetona sobre a lâmina, descorando-a até que não desprendesse mais o corante. A lâmina foi lavada rapidamente com cuidado em um filete de água corrente. E por último, foi adicionado a fucsina de Gram por 30 segundos, depois lavada e seca ao ar. O método de coloração de Gram foi desenvolvido por um médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, em 1884. Segundo seus conceitos, quando é aplicado o cristal violeta, as estruturas celulares se coram de roxo e com a adição do lugol, ocorre a formação do complexo iodo-pararosanilina, o qual fixa a primeira solução nas estruturas coradas. Porém, com a adição do descorante à base de álcool-acetona, colônias Gram-negativas que possuem parede celular composta predominantemente por ácidos graxos (lipolissacarídeos e lipoproteínas), perdem o complexo iodo-pararosanilina, e assumem a cor da fucsina (rosa), solução a qual é adicionada após o descorante. Já as Gram-positivas (foco do trabalho) devido a sua parede bacteriana composta por mureína (peptídeoglicano - peptídeo de ácido n-acetil murâmico), o que a torna rígida e forte, retém a solução de cristal violeta durante o processo de descoloração, tornando as células destas bactérias de coloração roxa (MS, 2001).

4.4. Técnica de Azul Brilhante Coomassie (CBB)

Esta técnica permite a coloração dos cristais de proteína e melhor resolução para a visualização sob microscópio óptico (MUNIADY et al., 2011). Como os esporos são vazios, apenas a borda dos esporos e os cristais são corados. Para a realização desta técnica, as estirpes selecionadas após o teste de Gram foram cultivadas em 4 ml de meio GYS até a fase de autólise da célula (5 dias) a 30°C em 250 rpm. Uma alíquota de cada colônia em autólise foi transferida para uma lâmina de vidro limpa, seca ao ar e fixada por calor. O esfregaço foi corado por 3 min com o corante constituído por: 0,25 g de azul Coomassie; 50 ml de metanol (CH_3OH); 7 ml de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$) e 100 ml de água destilada. Retirou-se o excesso em água corrente e deixado secar ao ar. A análise da esporulação e a presença dos possíveis cristais de toxina foram examinadas utilizando microscópio óptico com aumento de 2000x. Foi feito a descrição da morfologia do esporo e das toxinas para cada amostra. As estirpes foram selecionadas de acordo com a qualidade da esporulação (quantidade dos esporos), morfologia dos esporos e a presença ou não de estruturas coradas (possíveis toxinas).

As amostras elegidas foram preservadas de duas maneiras: em glicerol e em papel filtro. Para preservação em glicerol foi adicionado 250 μL do glicerol mais 250 μL da amostra determinada, e em seguida, estocada a -20°C para futuros experimentos. Já o armazenamento em papel filtro, foram cortadas pequenas tiras de papel filtro de 2-3 x 0,3-0,5 cm (comprimento x largura) e esterilizadas. Para cada amostra foram utilizadas 5 tiras, as quais foram submersas por 30 minutos no meio em que foram crescidas. Após o tempo determinado, as tiras foram espalhadas em placas de Petri esterilizadas e deixadas secar por aproximadamente 2 horas. Depois de secas, as tiras foram armazenadas em tubos criogênicos estéreis para futuros experimentos.

4.5. Bioensaio

Para realização da análise do efeito de toxicidade das estirpes selecionadas contra as larvas de *Aedes aegypti* existem dois tipos de bioensaios: o seletivo e de dose (CL_{50}). O primeiro discrimina quais estirpes apresentam atividade entomopatogênica. Já o bioensaio de dose, serve para calcular a virulência da estirpe, ou seja, a concentração letal para matar 50% da população testada (CL_{50}).

4.5.1. Bioensaio seletivo

As estirpes de *Bacillus* foram cultivadas em 20 ml de meio Embrapa (8 g/l de meio nutriente, 1 g/l extrato de levedura, 1 g/l de fosfato de potássio e 10 ml de sais) a 28°C em 200 rpm por 72 h (tempo de autólise da célula). Após 72 H foram realizadas lâminas para a confirmação da presença de esporos e proteínas de acordo com a técnica de CBB.

Realizou-se bioensaios seletivos com 65 estirpes (39 das estirpes selecionadas neste projeto mais 26 estirpes selecionadas no laboratório por outro estudante) contra larvas de *A. aegypti*. As larvas foram obtidas da criação de insetos do Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPAT) da Universidade Federal de Sergipe. Para a realização do teste, foram separados 2 copos descartáveis de 200 ml para cada estirpe, cada copo contendo 100 ml de água destilada e 25 larvas no 3º estágio. Foi utilizado 1 ml da amostra crescida em meio Embrapa líquido para cada copo com 100 ml de água. Todos os bioensaios realizados foram incluídos o controle positivo (*Bti*) e o negativo (apenas com água). Após 24 h e 48 h, foi feito a leitura do número de larvas mortas. Considerou-se as estirpes patogênicas as quais apresentaram 50% ou mais de mortalidade às larvas (SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Coleta das amostras

Foram coletadas 15 amostras de solos provenientes de diferentes origens, entre plantações convencionais e orgânicas, como de pimenta, alface, aloe vera, manjerição, bananeira e maracujá; de ambientes naturais ou menos antropizados; de solo adubado com esterco caprino e de região praiana (Tabela 2).

Bacillus thuringiensis é uma espécie que pode ser encontrada além de diferentes tipos de solos, como também em sedimentos marinhos, espécies vegetais ou insetos mortos (SMITH e COUCH, 1990; LÓPEZ-MEZA e IBARRA, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998; MAEDA *et al.*, 2000; MONNERAT *et al.*, 2007; RABINOVITCH e VIVONI, 2016). O solo foi a fonte escolhida por ser de fácil acesso e manuseio.

5.2. Processamento das amostras

Para cada amostra de solo foram isoladas 10 colônias, totalizando 150 amostras analisadas. Os parâmetros analisados para a seleção das colônias estão detalhados na tabela 1 e foram baseados na descrição apresentada por Muniady *et al.* (2011) para colônias típicas de Bt (bordas regulares, coloração creme e opaca e com ligeira elevação) com pequenas modificações. Nenhuma colônia selecionada apresentou elevação. Algumas apresentaram aspecto translúcido, e outras com coloração amarelada (Apêndice 1). No entanto, estas diferenças morfológicas não influenciaram na esporulação e na produção de cristais quando analisado as lâminas, não sendo critério de descarte para seleção das amostras. Lenina *et al.* (2014), também encontrou diferenças similares em seu trabalho, como bordas irregulares e sem elevação, demonstrando também serem colônias Bt.

Tabela 1. Parâmetros morfológicos de seleção.

FORMATO	MARGEM	COLORAÇÃO	ELEVAÇÃO
Redonda	Regular	Creme e opaca	Com
	Irregular	Creme e translúcida	Sem
		Amarelada e opaca	
		Amarelada e translúcida	

5.3. Teste de Gram e análise das células vegetativas

Apenas uma estirpe, proveniente do solo da plantação de manjerição, apresentou coloração rosada, a cor que bactérias Gram-negativas assumem por causa da fucsina. O restante das amostras foi confirmado como estirpes Gram-positivas. *Bacillus thuringiensis* é uma espécie Gram-positiva, e para comprovar que as estirpes isoladas no presente trabalho foram condizentes com essa característica de Bt, foi realizado o método de coloração de Gram. Esta técnica permite diferenciar dois grupos bacterianos, as Gram-negativas e Gram-positivas.

Para a realização do teste, as estirpes deveriam estar ainda na fase vegetativa, sendo possível analisar a estrutura de suas células antes do momento da esporulação. As células vegetativas das estirpes selecionadas encontraram-se de três maneiras distintas: células vegetativas solitárias, em duplas ou em cadeias longas de células, podendo apresentar apenas uma dessas características ou a combinação entre duas (ver Apêndice 1)

5.4. Seleção das estirpes Bt

No total de 150 amostras, 85 amostras foram selecionadas como colônias Bt, ou seja, apresentaram esporulação completa com objetos corados próximos, aparentando serem colônias Bt. As amostras restantes foram descartadas pelos seguintes motivos: não apresentaram crescimento, apresentaram células

vegetativas que não eram bastonetes, não ocorreu esporulação ou que não apresentaram objetos corados próximo aos esporos. Resumindo, dentre 150 estirpes de 15 diferentes regiões de Sergipe, 85 exibiram isolados com produção de proteínas.

Segundo Patel *et al.* (2013), em sua pesquisa foram encontradas amostras com maiores porcentagens de Bt por solo (55-75%) comparado aos métodos de acetato de sódio e pré-tratamento de calor a seco. No presente trabalho, como mostrado na Tabela 2, dentre as 15 amostras de solo coletadas, 9 apresentaram mais de 60% de isolados produzindo cristais de proteína. Entre as amostras restantes, 5 apresentaram 40-50% dos isolados com proteínas, e apenas o solo à beira da cachoeira (CAC) foi encontrado uma pequena quantidade de estirpes (20%) produzindo cristais.

Entretanto, realizou-se ainda uma seleção entre as 85 estirpes selecionadas, para eliminar as que não apresentaram esporulação muito eficiente (poucos esporos e cristais produzidos) ou que eram provenientes do mesmo solo com as mesmas características (clones). Para determinação de clones foi comparado a descrição morfológica da colônia, dos esporos e dos cristais. Se possuísem as mesmas características, apenas uma era selecionada por solo. Ao final, foram eleitas 39 amostras e provenientes de todas as amostras de solo, as quais foram destinadas para experimento de bioensaio e enviadas para sequenciamento (Tabela 2).

Tabela 2. Número de colônias Bt selecionadas para cada amostra de solo

SOLOS AMOSTRADOS	CI (N)	% DE <i>Bt</i> /SOLO	N SELECIONADOS PARA BIOENSAIO/SEQUENCIAMENTO
Solo orgânico 2 (ORG. 2)	10 (5)	50	5
Plantação de maracujá (MAR)	10 (7)	70	5
Solo restaurante (RES)	10 (6)	60	3
Solo da Serra de Itabaiana (SER)	10 (9)	90	3
Plantação de alface (ALF)	10 (6)	60	2
Plantação de pimenta (PIM)	10 (4)	40	2
Plantação de aloe vera (orgânica) (A.V.)	10 (4)	40	2
Plantação de manjerição (orgânica) (M)	10 (8)	80	4
À margem do Rio São Francisco (SF)	10 (7)	70	2
Plantação de bananeira (orgânica) (BAN)	10 (4)	40	1
Solo da Mata Atlântica (M.A.)	10 (6)	60	1
Solo a beira de cachoeira (CAC)	10 (2)	20	1
Solo adubado com esterco de cabra (CABRA)	10 (6)	60	3
Solo orgânico (zootecnia UFS) (ORG.ZOO)	10 (4)	40	2
Solo arenoso da região do Abaís (ABAIS)	10 (7)	70	3
TOTAL =	150 (85)		39

*CI, Número de colônias isoladas; N, Número de colônias de *Bacillus thuringiensis*

5.5. Análise da estrutura dos esporos e proteínas

Em relação aos esporos, foram encontrados três tipos morfológicos: esporos redondos com bordas grossas, esporos grandes com formato elipsoidal e borda fina e esporos pequenos com formato elipsoidal e borda fina (Apêndice 1). O formato dos esporos de Bt, denominado por Monnerat et al. (2008), seria a estrutura elipsoidal. Entre as 39 amostras selecionadas para bioensaio e sequenciamento, 31 apresentavam o formato elipsoidal (Figura 3), e apenas 8 com o formato redondo (Figura 4). Esporos com a morfologia redonda também foram selecionados porque aparentavam possuir proteínas acopladas ao espora.

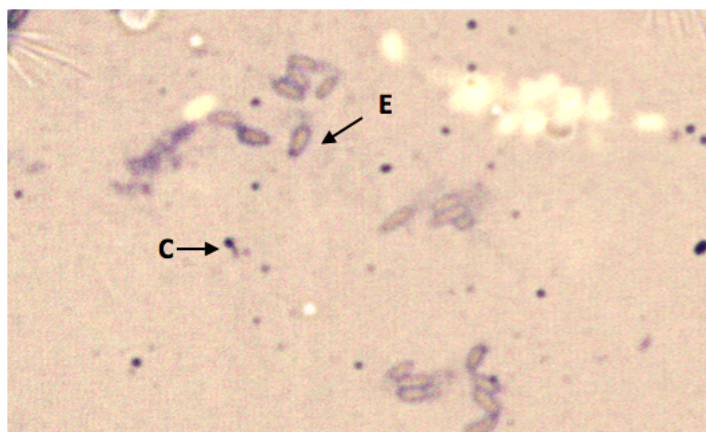


Figura 3. Formato elipsoidal dos esporos e proteínas redondas e não acopladas aos esporos. C: cristal; E: espora

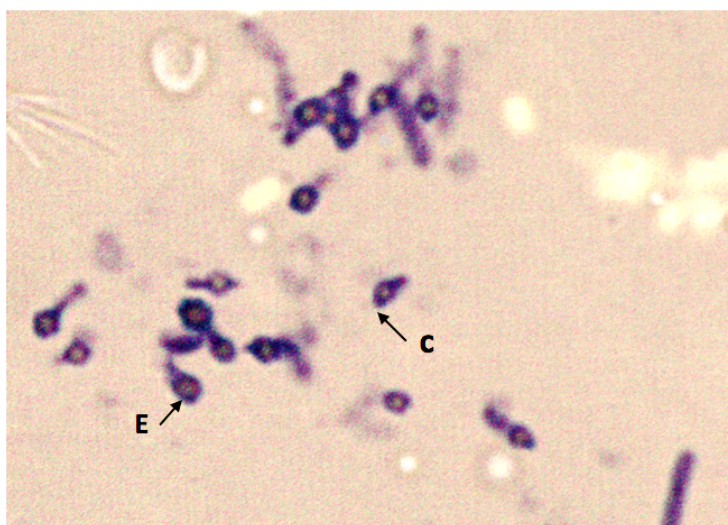


Figura 4. Formato redondo dos esporos e proteínas acopladas aos esporos
C: cristal; E: espora

Os cristais de proteína são diferenciados, normalmente, em cinco tipos: rombóide, bipiramidal, esférico, cubóide e formas irregulares (KAELIN, 1994;

BERNHARD et al., 1997; WHO, 1999; LENINA et al., 2014). Para amostras de solo, já foram relatados cristais com formas esféricas ou irregulares com efeito tóxico contra dípteros (LOPEZ-MEZA e IBARRA, 1996; LENINA et al., 2014). Porém, existem autores que não afirmam a correlação da morfologia do cristal com toxicidade à específico organismo (OHBA, 1995; BERNHARD et al., 1997;)

No presente trabalho foram encontradas proteínas tanto acopladas ao esporo como não acopladas. Dentre as 39 amostras selecionadas, o tipo de morfologia presente em cristais não acoplados foram: formato redondo (30) (Figura 3), irregular (2), bipiramidal (1) e cuboide (1). Destas, algumas apresentaram dois tipos de estrutura de cristais. Foram observadas 15 estirpes com proteínas acopladas, que possuíam morfologia do tipo “cap-like” e redondas. As categorizadas no tipo “cap-like” (estrutura em que a proteína acompanha o formato da extremidade do esporo) foram provenientes do solo com adubo caprino (CABRA 5) (Figura 5) e do solo de manjerição (M6) (Figura 6).

As descrições do tipo de esporo e de proteínas produzidas por cada estirpe podem ser vistas na tabela anexada ao Apêndice 1. Já a quantidade de estirpes para cada tipo de cristal produzido está resumida na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Resumo do número de estirpes e as respectivas estruturas dos seus cristais.

CRISTAIS					
Acoplados		Não acoplados			
Tipo “cap-like”	Redondo	Redondo	Irregular	Bipiramidal	Cuboide
2	13	30	2	1	1

O método de isolamento utilizado não adicionou nenhum tipo de antibiótico, como Polimixina ou Penicilina, para isolar estirpes de *Bacillus thuringiensis*. Estudos

verificaram que algumas estirpes de Bt são resistentes a estes antibióticos, porém não todas (RAMPERSAD e AMMONS, 2005; PATEL et al., 2013). Então a utilização do antibiótico poderia restringir o número de estirpes não resistentes por amostra de solo, mas também pode descartar estirpes patogênicas à alguma espécie-alvo. Por fim, como observado no estudo de Rampersad e Ammons (2005), em que não foi utilizado antibiótico, mais estirpes produziram proteínas incomuns para Bt, que seriam as proteínas não acopladas redondas e pequenas (como Figura 3), que também foi o resultado mais obtido no presente trabalho.

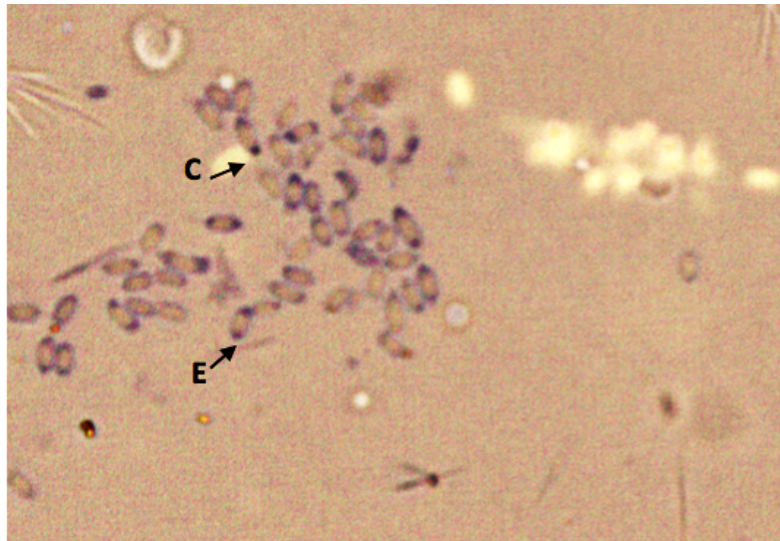


Figura 5. Formato elipsoidal dos esporos e proteínas acopladas nas duas extremidades dos esporos ("cap-like"). C: cristal; E: espora.

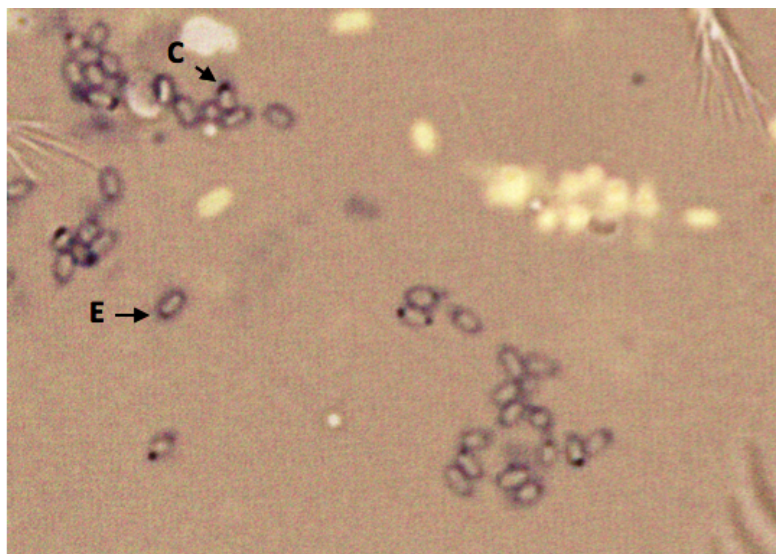


Figura 6. Formato elipsoidal dos esporos e proteínas acopladas em apenas uma extremidade (“cap-like”). C: cristal; E: espora

5.6. Bioensaio

Foi observado que o controle positivo (Bti) matou o total das larvas que estavam presentes em aproximadamente 10 minutos e o controle negativo não demonstrou agir sobre as larvas. Em relação às amostras de Bt isoladas para este trabalho e testadas contra as larvas de *Ae. aegypti* (L3) não foi encontrado toxicidade em nenhum bioensaio realizado. Isto não é um caso incomum, já que as toxinas Cry são muito específicas a um determinado grupo de organismos, e no presente trabalho realizado o teste foi feito apenas com uma espécie. Esta especificidade advém dos receptores presentes nas células dos organismos que se associam a determinada proteína (BROBOWSKI *et al.*, 2003).

Ademais, o número de colônias pode ter sido baixo em relação a outros artigos publicados que demonstraram resultados positivos à toxicidade contra *Aedes*. Grande parte dos trabalhos utilizam número muito elevado de isolados que são testados em bioensaio, geralmente mais de 1000 colônias isoladas (IBARRA *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2010), e dentre estas, em média, apenas 5 a 10% apresentam toxicidade contra larvas de *Ae. aegypti*.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível isolar e caracterizar estirpes de *Bacillus thuringiensis* e analisar a presença de esporos e objetos corados próximos a estes, demonstrando serem possíveis cristais de proteínas, criando-se assim um banco de cepas de *Bt*.

Como considerações finais, as estirpes estão em processo de sequenciamento para a análise do tipo de proteínas produzidas e assim, poderem ser aplicados para futuros experimentos, por exemplo, a criação de toxinas híbridas (mais tóxicas). Apesar de que, não termos encontrado nenhuma estirpe tóxica contra as larvas do *Aedes aegypti*, projetos no laboratório estão sendo planejados e desenvolvidos para avaliar a toxicidade destas contra outros organismos, inclusive contra células cancerígenas humanas e protozoários.

REFERÊNCIAS

- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n.4, p. 945-958, 2010.
- ARONSON, A. I.; FITZ-JAMES, P. (1976). Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 2, p. 360, 1976.
- BARIFOUSI, R. (2015) De dengue a zika: Por que o mosquito do *Aedes aegypti* transmite tantas doenças? Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/bbc/2015/12/02/por-que-o-mosquito-aedes-aegypti-transmite-tantas-doencas.htm> Acessado em: 14 de fevereiro de 2017.
- BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. **Toxins**, v. 6, n. 4, p 1222-1243, 2014.
- BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 59-68, 1977.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 34, p. 843-850, 2003.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.16, p. 279-293, Brasília, 2007.
- CALIFORNIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH (2015). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. Disponível em: <https://www.cdph.ca.gov/HealthInfo/discond/Pages/Aedes-albopictus-and-Aedes-aegypti-Mosquitoes.aspx>. Acessado em: 23 de outubro de 2016.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P.; MALM, O. (DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, v. 25, p. 995-1002, 2002.

DA SILVA, E. L.; ARRUDA, E. J.; ANDRADE, C. F. S.; FERNANDES, M. F.; TEIXEIRA, T. Z.; DA SILVA SCUDELER, C. G.; CABRINI, I. Avaliação da susceptibilidade ao temephos de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) dos municípios de Maracaju e Naviraí, MS, Brasil. **BioAssay**, v. 10, 2015

DE SOUZA LIMA, G. M. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 119-137, 2013.

DELÉCLUSE, A.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**, p. 101-125. Springer Netherlands, 2010.

DELUCCA II, A. J.; SIMONSON, J. G.; LARSON, A. D. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 865-870, 1981.

ELLEUCH, J., JAOUA, S., DARRIET, F., CHANDRE, F., TOUNSI, S., & ZGHAL, R. Z. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 104, p. 83-90, 2015.

FINNEY, D. J. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1971.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 38, p. 32-35, 2009.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. D. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-24, 2004.

GIDDINGS, M. M.; MAGARA, Y.; OHANIAN, E. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in drinking-water, 2009.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Report for the Ministry of Health**, v. 58, 1998.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosq. News**, v. 37, p. 355-358, 1997.

BOGAZ, C. (2017) Levantamento sobre infestação de mosquito passa a ser obrigatório .Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/pt/noticias/904-levantamento-sobre-infestacao-do-mosquito-passa-a-ser-obrigatorio>. Acesso em: 13 de out. de 2016.

HABIB, M.E.M. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 84, Rio de Janeiro, 1989.

HASTOWO, S.; LAY, B. W.; OHBA, M. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. **Journal of applied bacteriology**, v. 73, p. 108-113, 1992.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 3, p. 1031-1034, 2016.

HU, Y.; GEORGHIOU, S. B.; KELLEHER, A. J.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, e614, 2010.

IBARRA, J. E.; DEL RINCÓN, M. C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; SÁNCHEZ, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (2008). Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32>. Acessado em : 19 de abril 2017.

ITO, A., SASAGURI, Y., KITADA, S., KUSAKA, Y., KUWANO, K., MASUTOMI, K., MIZUKI, E.; AKAO, T.; OHBA, M. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21282-21286, 2004.

KAELIN, P.; MOREL, P.; GADANI, F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne*. **Applied and environmental microbiology**, v.60, p. 19-25, 1994.

KITADA, S., ABE, Y., SHIMADA, H., KUSAKA, Y., MATSUO, Y., KATAYAMA, H., OKUMURA, S.; AKAO, T.; MIZUKI, E.; KUGE, O.; SASAGURI, Y. Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26350-26360, 2006.

LENINA, N. K.; NAVEENKUMAR, A.; SOZHAVENDAN, A. E.; BALAKRISHNAN, N.; BALASUBRAMANI, V.; UDAYASURIYAN, V. Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. **3 Biotech**, v. 4, n. 5, p. 545-551, 2014.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 36, 2016

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOPEZ-MEZA, J. E.; IBARRA, J. E. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, p. 1306-1310, 1996.

MACORIS, M. D. L. D. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; OTRERA, V. C. G.; CARVALHO, L. R. D.; CALDAS JÚNIOR, A. L.; BROGDON, W. G. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 895-900, 2007.

MAEDA, M.; MIZUKI, E.; NAKAMURA, Y.; HATANO, T.; OHBA, M. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. **Current microbiology**, v. 40, p. 418-422, 2000.

MATSUMURA, A.T.S.; RIBAS, P.P. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e o meio ambiente. **Revista Liberato**, v.10, p. 149-158, Novo Hamburgo, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017 <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde: Viajantes. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/435-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/dengue/l1-dengue/11000-viajantes-dengue>. Acesso em: 13 de out. de 2016.

MONNERAT, R.; SOARES, C.; ROBERG, R.; DUMAS, V.; RAMOS, F.; PRAÇA, L.; SUJII, E. Bt-horus, um biolarvicida à base da *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de *Aedes aegypti*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2008.

MIZUKI, E.; PARK, Y. S.; SAITOH, H.; YAMASHITA, S.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; OHBA, M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 7, n. 625–634, 2000.

MUNIADY, S.; RATHINAM, X.; SUBRAMANIAM, S. Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from

chicken manure samples. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 3131-3137, 2011.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; DE VASCONCELOS, J. M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U.; DE OLIVEIRA, L. F.; & CARVALHO, V. L. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.

OHBA, M. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 1, p. 56-64, 1996.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PATEL, K. D.; CHAUDHARY, A. V.; INGLE, S. S. A new enrichment method for isolation of *Bacillus thuringiensis* from diverse sample types. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 58-66, 2013.

PENNA, M. L. F. Um desafio para saúde pública brasileira: o controle da dengue. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p.305-309, Rio de Janeiro, 2003.

PETRY, F.; LOZOVEI, A.L.; FERRAZ, M.E.; NETO, L.S. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 48, p. 127-132, 2004.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle do *Aedes aegypti*. **Rev Saúde Pública**, v.37, p. 813-816, São Paulo, 2003.

PRAÇA, L. B.; MARTINS, E., MELATTI, V. M.; MONNERAT, R. G. *Bacillus Thuringiensis* Berliner (EUBACTERIALES: BACILLACEAE): aspectos gerais, modo de ação e utilização. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos**, 2007.

RABINOVITCH, L.; VIVONE, A.M. *Bacillus e bacillus cereus* com suas facetas como bactérias esporuladas Gram-positivas. **UPpharma**, p. 8-10, 2016.

RAMBERSAD, J.; AMMONS, D. A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. **BMC microbiology**, v. 5, p. 52, 2005.

SANTANA, M. A.; MOCCIA-V, C. C.; GILLIS, A. E. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. **Journal of microbiological methods**, v. 75, p. 357-358, 2008.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant biotechnology journal**, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N. V.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, p.775-806, 1998.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001.

SMITH, R. A.; COUCHE, G. A. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 311-315, 1991.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *López-Munguía, A., Una ventana al quehacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM*. v. 25, p. 303-314, 2008.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, p. 867-871, Rio de Janeiro, 2002.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, v. 2, n. 3, 194-208, 2006.

TRAVERS, R. S.; MARTIN, P. A.; REICHELDERFER, C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1263-1266, 1987.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue and chikungunya: challenges and issues. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 419-422, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informal consultation on the development of *B. sphaericus* as a microbial larvicide, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Microbial pest control agent: *Bacillus thuringiensis*, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of informal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H-14. **Mimeographed documents TDR/BVC/BTH-14, WHO/VCB/81-828, Geneva. [Links]**, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 13 de out de 2016.

ZARA, A. L. D. S. A.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

APÊNDICE

Apêndice 1. Descrição das colônias selecionadas para bioensaio e sequenciamento

COLÔNIAS	DESCRIÇÃO			
	Morfologia da cepa	Célula vegetativa	Esporos	Proteínas
SOLO ORGÂNICO 2				
ORG.2.1	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
ORG.2.3	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em dupla ou solitários.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina..	Toxinas acopladas ao esporo.
ORG.2.5	Borda irregular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação.	Agrupados em dupla ou solitários.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
ORG.2.8	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Encontra-se solitários.	Esporos grandes e redondos. Espessura grossa da borda.	Toxinas soltas no ambiente e acopladas ao esporo. Formato redondo.
ORG.2.10	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Encontra-se solitários.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e acopladas ao esporo. Formato redondo.
PLANTAÇÃO DE MARACUJÁ				
MAR 2	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em duplas e cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
MAR 3	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Encontra-se em dupla ou solitários.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
MAR 5	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em duplas e cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
MAR 8	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
MAR 10	Borda irregular. Coloração creme e translúcida. Sem	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.

	elevação.		borda fina.	
SOLO RESTAURANTE				
RES 1	Borda irregular. Coloração creme e translúcida. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
RES 2	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
RES 9	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
SOLO DA SERRA DE ITABAIANA				
SER 5	Borda irregular. Coloração creme e translúcida. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
SER 7	Borda regular. Coloração creme e translúcida. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
SER 10	Borda irregular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
PLANTAÇÃO DE ALFACE				
ALF 5	Borda regular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação.	Geralmente agrupados em dupla	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas acopladas ao esporo
ALF 10	Borda irregular. Coloração creme e translúcida. Sem elevação.	Geralmente agrupados em dupla	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas acopladas ao esporo
PLANTAÇÃO DE PIMENTA				

PIM 2	Borda regular. Coloração amarelada e opaca. Sem elevação.	Encontra-se tanto isolados como em cadeia.	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas acopladas ao esporo
PIM 8	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
PLANTAÇÃO DE ALOE VERA (ORGÂNICA)				
A.V. 6	Borda regular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação.	Encontram-se solitários	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas acopladas ao esporo
A.V. 7	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Encontra-se tanto dupla como em cadeia.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
PLANTAÇÃO DE MANJERICÃO (ORGÂNICA)				
M 2	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Encontram-se solitários	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas soltas no ambiente de formato redondo e acopladas ao esporo.
M 3	Borda regular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação.	Encontram-se solitários e em duplas.	Esporos pequenos com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
M 4	Borda irregular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas acopladas ao esporo
M 6	Borda irregular. Coloração creme e translúcida. Sem elevação.	Geralmente agrupados em dupla	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente de formato redondo. Acopladas ao esporo nas duas extremidades do tipo “cap-like”
À MARGEM DO RIO SÃO FRANCISCO				
SF 5	Borda regular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação	Encontra-se solitários	Esporos pequenos com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
SF 9	Borda irregular.	Geralmente	Esporos grandes	Toxinas soltas no

	Coloração creme e opaca. Sem elevação.	agrupados em dupla	com formato elipsoidal com borda fina.	ambiente e de formato redondo.
PLANTAÇÃO DE BANANEIRA (ORGÂNICA)				
BAN 8	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação.	Agrupados em cadeias longas.	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente de formato redondo e acopladas ao esporo.
SOLO DA MATA ATLÂNTICA				
M.A. 8	Borda irregular. Coloração creme e translúcida. Sem elevação.	Encontra-se solitários	Esporos redondos com borda grossa.	Toxinas acopladas ao esporo
SOLO A BEIRA DE CACHOEIRA				
CAC 1	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação	Agrupados em cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente. Formato redondo, bipiramidal e cubóide
SOLO ADUBADO COM ESTERCO DE CABRA				
CABRA 5	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação	Agrupados em cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente de formato redondo. Acopladas ao esporo do tipo "cap-like"
CABRA 7	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação	Agrupados em cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente de formato redondo e acopladas ao esporo.
CABRA 8	Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação	Agrupados em cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo ou irregular
SOLO ORGÂNICO (ZOOTECNIA UFS)				
ORG.ZOO.2	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação	Agrupados em duplas ou cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.
ORG.ZOO.8	Borda regular. Coloração creme e opaca. Sem elevação	Agrupados em cadeias longas	Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.	Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo ou irregular.

SOLO ARENOSO DA REGIÃO DO ABAÍS	
ABAÍS 1	<div>Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação</div> <div>Agrupados em cadeias longas</div> <div>Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.</div> <div>Toxinas soltas no ambiente de formato redondo e acopladas ao esporo.</div>
ABAÍS 2	<div>Borda irregular. Coloração amarelada e translúcida. Sem elevação</div> <div>Agrupados em cadeias longas</div> <div>Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.</div> <div>Toxinas soltas no ambiente de formato redondo e acopladas ao esporo.</div>
ABAÍS 5	<div>Borda irregular. Coloração creme e opaca. Sem elevação</div> <div>Agrupados em cadeias longas</div> <div>Esporos grandes com formato elipsoidal com borda fina.</div> <div>Toxinas soltas no ambiente e de formato redondo.</div>